

RO/KR 20.05.2004

KR04/01210



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0084934
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 11월 27일
Date of Application NOV 27, 2003

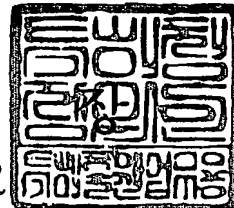
출원인 : 한국과학기술원
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Techno



2004 년 05 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(A) OR (B)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2003.11.27
【발명의 명칭】	루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Variant of Lumen Bacteria and Process for Preparing Succinic Acid Employing the Same
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE, SANG YUP
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상준
【성명의 영문표기】	LEE, SANG JUN
【주민등록번호】	710829-1121313
【우편번호】	305-330
【주소】	대전광역시 유성구 지족동 대우아파트 305-604
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 (KRIBB)
【수탁번호】	KCTC 10558BP

【수탁일자】 2003.11.26
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 21
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이처영 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 18 면 18,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 18 항 685,000 원
【합계】 732,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 366,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 루멘 박테리아에서 젖산, 개미산 및 초산 생성에 관여하는 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase) 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase) 유전자(pfl)를 모두 결실시켜 수득되고, 숙신산을 고수율로 생산하는 신규 루멘 박테리아 변이균주 및 상기 변이균주를 혐기적인 조건에서 배양하여 숙신산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 만헤이미아 속 LPK 균주는 여러가지 유기산을 생산하는 종래의 야생형의 균주에 비하여, 다른 유기산을 거의 생성하지 않으면서 고농도로 숙신산을 생성하는 특성을 가지고 있어 숙신산의 산업적 생산 균주로 유용하다.

【대표도】

도 5

【색인어】

숙신산, 유기산, 젖산, 개미산, 만헤이미아 속

【명세서】

【발명의 명칭】

루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법{Variant of Lumen Bacteria an Process for Preparing Succinic Acid Employing the Same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 ldhA 유전자 결실 벡터(pMLKO-sacB)의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 2는 pf1 유전자 결실 벡터(pMPKO-sacB)의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 3은 만헤이미아 속 55E 균주의 ldhA 및 pf1 유전자를 결실시켜 변이주(LPK)를 제작하는 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 만헤이미아 속 변이주(LPK)의 ldhA 및 pf1 유전자를 결실을 확인한 전기영동 사진이다. M은 Lambda HindIII size marker를, 레인 1-3은 PCR product LU1 & KM1(1.5kb)을, 레인 4-6은 PCR product LD2 & KM2(1.7kb)를, 레인 7-9는 PCR product PU1 & CM1(2.2kb)을, 레인 10-12는 PCR product PD2 & CM2(1.6kb)를 나타낸다.

도 5는 이산화탄소로 포화된 혐기조건에서 만헤이미아 속 LPK의 배양 특성을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 발명의 분야

<7> 본 발명은 루멘 박테리아에서 젖산, 개미산 및 초산 생성에 관여하는 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase) 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase) 유전자(pfl)를 모두 결실시켜 수득되고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고수율로 생산하는 신규 루멘 박테리아 변이균주 및 상기 변이균주를 혐기적인 조건에서 배양하여 숙신산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<8> 발명의 배경

<9> 현재 석유화학공업의 발달로 인하여 대부분의 화학물질들이 석유 및 천연가스로부터 생산되고 있으나, 최근 지구온난화현상 등 환경문제의 대두로 전세계적으로 환경규제가 강화되어, 화학물질의 생산을 위한 대체공정의 개발에 대한 요구가 증가되고 있다.

<10> 이에 따라, 미생물 배양기술과 유전공학적 기술의 획기적인 발달에 힘입어 생물공정에 의한 생물학적 물질(biochemical)의 생산이 점차 석유화학공정에 대하여 경쟁력을 갖게 되었다. 생물학적인 방법은 값싼 재생자원(renewable resource)을 원료로서 이용하고, 이산화탄소 등 지구온난화가스의 발생을 공정상에서 억제할 수 있기 때문에 환경문제를 근본적으로 해결할 수 있는 환경친화적 공정으로 알려져 있으므로, 균주개발 및 공정개선 등 원가절감을 위한 연구가 확대되고 있는 추세이다. 아울러, 생물학적 물질의 시장성이 매우 높아지고 있어, 미생물을 이

용하여 생물자원(biomass)으로부터 생물학적 물질의 생산에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다.

<11> 이러한 생물학적 물질 중에서, 숙신산(succinic acid)은 생분해성 플라스틱 모노머, 식품첨가제, 의약품의 전구물질, 기타 유기화합물의 중간체 등 그 다양한 이용성과 가격경쟁력을 갖추고 있어 이에 대한 관심이 날로 증가하는 추세이다.

<12> 숙신산의 생물학적 생산에 대한 연구는 1938년 록우드(Lockwood) 등이 미생물인 푸사리움 마티(*Fusarium martii*)를 이용하여 당으로부터 18%의 수율로 숙신산을 생산한 것을 발표하면서 시작되었다. 그 후, 숙시니비브리오 텍스트리노솔벤스 (*Succinivibrio dextrinosolvens*), 피브로박터 숙시노게네스(*Fibrobacter succinogenes*), 루미노코커스 플라브파시엔스(*Ruminococcus flavefaciens*) 등을 포함한 다양한 종류의 혐기성 미생물이 포도당 대사를 통하여 숙신산을 최종산물로 생성하는 것으로 보고되었다(Zeikus, Annu. Rev. Microbiol., 34:423-464, 1980). 그 이후, 과량의 이산화탄소 존재시에 포도당으로부터 높은 농도와 수율로 숙신산을 생산하는 것으로 알려진 언에어로바이오스피리illum 숙시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)를 제외하고는, 산업적으로 유용한 높은 수율로 숙신산을 생산하는 균주는 보고되지 않았다(David et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 26:498-504, 1976). 그러나, 언에어로바이오스피리illum 숙시니시프로두센스는 절대 혐기적인 미생물이기 때문에, 이를 이용하여 숙신산을 생산하는 발효공정은 미량의 산소에 노출되더라도 공정자체가 불안정해지는 단점이 있다.

<13> 미생물의 발효를 통해 유기산을 경제적으로 생산하기 위하여는, 생산수율, 발효의 조건 등과 같은 여러가지 문제점의 해결이 선행되어야 하는데, 그 중에서도 가장 우선되어야 할 문

제점은 새로운 균주의 개발이다. 현재 사용되는 대부분의 미생물은 혐기성 미생물로서, 배양을 위한 설비비용이 비싸고, 미량의 산소에 의한 발효실패의 확률이 높다는 단점이 있다.

<14> 이러한 단점을 개선하기 위하여, 산소에 대해 저항성을 가지면서 유기산의 생산성이 높은 균주인 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E)가 개발되었다. 그러나 상기 균주는 숙신산 외에도 개미산, 초산 및 젖산을 생성하기 때문에, 숙신산 이외의 다른 유기산을 제거하는 정제과정에서 비용증가와 수율저하의 문제가 있어, 이를 해결하고자 하는 노력이 절실히 요구되었다.

<15> 한편, 숙신산 생산을 위하여 재조합된 대장균에 대해서는 여러 문헌에서 보고된 바가 있다. 대장균의 경우는 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자가 결실되면, 혐기적조건에서 거의 생육을 하지 못한다. 또한, 젖산은 발효산물로 나오지 않지만, 다른 대사산물인 초산과 에탄올이 숙신산 생산량의 절반 가량을 각각 차지하여 산업화하기에는 수율이 너무 낮은 단점이 있다. 최근에는 이러한 단점을 보완하기 위하여, 호기조건에서 대장균의 균체를 증식시킨 다음, 다시 혐기조건으로 바꾸어 숙신산 발효를 유도한 논문(Vemuri et. al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 28:325-332, 2002)이 발표된 바가 있으나, 여전히 생산성이 낮다는 단점이 있다.

<16> 또한, 유전공학적 기법으로 숙신산 발효의 대사회로에서 이산화탄소를 고정하는 유전자인 pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, pyruvate carboxykinase, malic enzyme 등을 대장균에 도입하여, 숙신산 생산성을 높인 예가 보고되어 있다(Vemuri et al., Appl. Environ. Microbiol., 68:1715-27, 2002; Millard et al., Appl. Environ. Microbiol., 62:1808-10, 1996; Chao and Liao, Appl. Environ. Microbiol., 59:4261-5, 1993; Stols and

Donnelly, Appl. Environ. Microbiol., 63:2695-701, 1997). 최근에는 이들 유전자를 대장균 이외에 루멘 박테리아(rumen bacteria)인 *Actinobacillus* sp.와 *Anaerobiospirillum* sp. 등의 다른 미생물에 도입하는 시도가 진행되고 있어, 상기 방법을 이용한 숙신산의 생산성 향상이 기대된다. 한편, 대장균에서 ptsG 유전자의 결실이 균체 생산과 숙신산의 생산성 향상에 기여하는 것으로 보고되어 있으나(Chatterjee et al., Appl. Environ. Microbiol., 67:148-154, 2001), 대부분의 루멘 박테리아는 ptsG 유전자를 가지고 있지 않으므로, 대장균의 경우와 같이, ptsG 유전자를 제거하는 과정이 필요 없다는 장점이 있다.

<17> 이에, 본 발명자들은 고수율로 숙신산을 생산하는 균주를 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 루멘 박테리아의 일종인 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E) 균주의 젖산, 개미산 및 초산 생성에 관여하는 유전자를 결실시켜 제작된 변이균주(*Mannheimia* sp. LPK)가 혐기적 조건하에서 숙신산을 고수율로 생산하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<18> 결국, 본 발명의 주된 목적은, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 생성하지 않으면서 숙신산을 고수율 및 고농도로 생성하는 루멘 박테리아 변이균주를 제공하는데 있다.

<19> 본 발명의 다른 목적은 상기 변이균주를 혐기적 조건하에서 배양하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성】

- <20> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 루멘 박테리아의 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주를 제공한다.
- <21> 본 발명에 있어서, 상기 루멘 박테리아 균주는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하며, 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.)에서 선택되는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 루멘 박테리아 변이균주는 혐기적 조건에서 다른 유기산은 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 동형발효 균주인 것을 특징으로 할 수 있다.
- <22> 본 발명은 또한, 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되는 루멘 박테리아 균주로부터 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자(pf1)를 결실시켜 수득되고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법을 제공한다.
- <23> 본 발명에 따른 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법에 있어서, 상기 ldhA 유전자와 pf1 유전자의 결실은 상동성 재조합(homologous recombination)에 의해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 상동성 재조합은 결실된 ldhA 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 및 결실된 pf1 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상

기 결실된 *ldhA* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 pMLK0-sacB이고, 상기 결실된 *pf1* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 pMPK0-sacB인 것을 특징으로 할 수 있다.

- <24> 본 발명은 또한, 결실된 *ldhA* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 pMLK0-sacB 및 결실된 *pf1* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 pMPK0-sacB를 제공한다.
- <25> 본 발명은 또한, 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E)의 *ldhA* 유전자와 *pf1* 유전자가 결실된 만헤이미아 속 LPK (*Mannheimia* sp. LPK, KCTC 10558BP) 균주를 제공한다.
- <26> 본 발명은 또한, 상기 균주를 혐기적 조건에서 배양하는 단계와 배양액으로부터 숙신산을 회수하는 단계를 포함하는 숙신산의 제조방법을 제공한다.
- <27> 본 발명에 따른 숙신산의 제조방법에 있어서, 혐기적 조건은 이산화탄소 및/또는 질소를 이용하여 조성하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 배양은 다른 유기산은 생성되지 않으면서 숙신산만이 생성되는 동형발효인 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한 배양은 35~45℃의 온도와 6.0~7.5의 pH에서 이산화탄소 또는 이산화탄소를 포함하는 공기를 0.1~0.4vvm의 유속으로 공급하면서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <28> 본 발명에 있어서, '결실'이란 용어는 상기 유전자에 의해 코딩되는 효소가 생성되지 못하도록 해당 유전자를 변형시킨 것을 모두 포괄한다.
- <29> 루멘 박테리아의 일종인 만헤이미아 속 55E(

Mannheimia succiniciproducens 55E) 균주의 유전체 정보로부터, 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase) 유전자와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase) 유전자인 *ldhA* 유전자와 *pfl* 유전자를 각각 찾은 다음, 이 두개의 유전자를 유전자 결실 벡터를 이용하여 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E)의 유전체에서 모두 제거함으로써 변이균주를 제작하였다. 또한 상기 제작된 변이균주는 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서, 숙신산을 고농도로 생산하는 것을 확인하였다. 상기 숙신산을 고농도로 생산하는 신규 미생물을 만헤이미아 속 LPK(*Mannheimia* sp. LPK)로 명명하고, 2003년 11월 26일자로 국제기탁기관인 한국생명공학연구원(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소재)에 기탁번호 'KCTC 10558BP'로 기탁하였다.

<30> 본 발명의 만헤이미아 속 LPK 균주는 모균주인 만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E, KCTC 0769BP)와 같이, 통성혐기성, 그람음성, 비운동성의 단간(rod) 또는 코코바실라이(cocobacilli) 균으로서, 내생포자(endospore)를 생성하지 않는 특성을 가지며, 혐기조건에서 숙신산을 생산할 수 있다. 상기 균주는 30~50℃의 온도범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육온도는 39℃이고, 6.0~7.5의 pH범위에서 생육이 관찰되나, 최적생육 pH는 6.5이다.

<31> 본 발명에 있어서, 상기 혐기적 조건은 이산화탄소 및/또는 질소를 이용하여 조성하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 숙신산의 수율을 높이기 위해서는 이산화탄소를 사용하여 조성하는 것이 가장 바람직하다.

<32> 혐기적 조건은 이산화탄소 또는 질소를 0.1~0.4vvm, 바람직하게는 0.2~0.3vvm, 가장 바람직하게는 0.25vvm의 유속으로 공급하여 조성되고, 호기적 조건은 산소를 0.5~1.0vvm, 바람직하게는 0.7~0.8vvm, 가장 바람직하게는 0.75vvm의 유속으로 공급하여 조성된다. 배양에 사용되

는 배지는 특별히 제한되지 않으나, 포도당 농도가 바람직하게는 5~60g/L이고, 가장 바람직하게는 20g/L이며, 배양온도는 35~45℃, 바람직하게는 38~41℃, 가장 바람직하게는 39℃의 온도와, 6.0~7.5, 바람직하게는 6.3~6.7, 가장 바람직하게는 6.5의 pH 조건하에서 수행된다.

<33> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<34> 특히, 하기 실시예에서는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.) 균주의 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자(pfl)를 결실시켜 변이균주를 수득한 다음, 이를 이용하여 숙신산을 고농도로 생성하는 방법만을 예시하였으나, 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.), 엔에어로바이오스피리움 속(*Anaerobiospirillum* sp.) 등 다른 루멘 박테리아 균주를 사용하여 상기 두 유전자가 결실된 변이균주를 수득하고, 이를 이용하여 숙신산을 제조하는 것 역시 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<35> 또한, 하기 실시예에서는 특정 배지와 배양방법 만을 예시하였으나, 본 발명자들이 문헌에 보고한 바와 같이(Lee et al., Bioprocess Biosyst. Eng., 26: 63-7, 2003; Lee et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 58:663-8, 2002; Lee et al., Biotechnol. Lett., 25:111-4, 2003; Lee et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 54:23-7, 2000; Lee et al., Biotechnol. Bioeng., 72:41-8, 2001), 유장(whey), CSL(corn steep liquor) 등의 당화액과 다른 배지를 사

용한 경우나, 유가배양(fed-batch culture), 연속배양(continuous culture) 등 다양한 방법을 사용한 것도 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<36> 실시예 1: 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase) 유전자인 ldhA 유전자 결실벡터 (pMLKO-sacB)의 제작

<37> 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase) 유전자인 ldhA 유전자를 상동성 재조합(homologous recombination) 방법으로 파괴하기 위하여, 유전자 교환벡터 (gene replacement vector)를 다음과 같이 제작하였다.

<38> 먼저, 만헤이미아 속 55E 균주(KCTC 0769BP)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 1과 2의 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 얻어진 PCR 절편을 *SacI*과 *PstI*으로 절단하고, 이를 pUC18(New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.)에 도입하여 pUC18-L1를 제작하였다.

<39> 서열번호 1: 5' -CAGTGAAGGAGCTCCGTAACGCATCCGCCG (프라이머 LS1)

<40> 서열번호 2: 5' -CTTTATCGAATCTGCAGGCGGTTTCCAAAA (프라이머 LP1)

<41> 그런 다음, 만헤이미아 속 55E 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 3과 4의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 얻어진 PCR 절편을 *PstI*과 *HindIII*으로 절단하고, 이를 상기 pUC18-L1에 도입하여 pUC18-L1-L2를 제작하였다.

<42> 서열번호 3: 5' -GTACTGTAAACTGCAGCTTTCATAGTTAGC (프라이머 LP2)

<43> 서열번호 4: 5' -GCCGAAAGTCAAGCTTGCCGTCGTTTAGTG (프라이머 LH2)

- <44> pUC4K(Pharmacia, Freiburg, Germany)를 *Pst*I으로 절단하여, 카나마이신 내성 유전자를 *Pst*I으로 절단한 pUC18-L1-L2와 융합시켜 pUC18-L1-KmR-L2를 제작하였다. *Sac*I으로 절단한 pUC18-L1-KmR-L2에 하기 서열번호 5의 링커를 삽입하여 새로운 *Xba*I 절단부위를 만들었다.
- <45> 서열번호 5: 5' -TCTAGAAGCT (링커 1)
- <46> pKmobSacB(Schafer et al., Gene 145:69-73, 1994.)를 주형으로 하고, 하기 서열번호 6과 7의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 다음, 수득된 산물을 *Xba*I으로 절단하고, 이를 상기 새로운 *Xba*I 제한효소 자리에 삽입하여 pMLKO-sacB를 제작하였다(도 1).
- <47> 서열번호 6: 5' -GCTCTAGACCTTCTATCGCCTTCTTGACG (프라이머 SXF)
- <48> 서열번호 7: 5' -GCTCTAGAGGCTACAAAATC ACGGGCGTC (프라이머 SXR)
- <49> 실시예 2: 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase) 유전자인 pfl 유전자 결실벡터 (pMPKO-sacB)의 제작
- <50> 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase) 유전자인 pfl 유전자를 상동성 재조합(homologous recombination) 방법으로 파괴하기 위하여, 유전자 교환벡터(gene replacement vector)를 다음과 같이 제작하였다.
- <51> 먼저, pKmobSacB를 주형으로 하고, 하기 서열번호 8과 9의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편을 *Pst*I과 *Bam*HI으로 절단하고, 이를 pUC19(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.)에 도입하여 pUC19-sacB를 제작하였다.
- <52> 서열번호 8: 5' -AGCGGATCCCCTTCTATCGCCTTCTTGACG (프라이머 SBG)
- <53> 서열번호 9: 5' -GTCCTGCAGGGCTACAAAATCACGGGCGTC (프라이머 SPR)

<54> 만헤이미아 속 55E 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 10과 11의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 얻어진 PCR 절편을 *Bam*HI으로 절단하고; 이를 *Bam*HI로 절단한 pUC19-sacB과 융합하여 pUC19-sacB-pfl를 제작하였다.

<55> 서열번호 10: 5' -CATGGCGGATCCAGGTACGCTGATTTCGAT (프라이머 PB1)

<56> 서열번호 11: 5' -CAAGGATCCAAC GGATAAAGCTTTTATTAT (프라이머 PB2)

<57> 클로람페니콜 내성 유전자를 얻기 위해서, pACYC184(New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.)를 주형으로 하고, 하기 서열번호 12와 13의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 다음, 상기 PCR 산물을 *Sma*I으로 절단하고, 이를 *Bst*1107I로 절단한 pUC19-sacB-pfl와 융합하여, pMPK0-sacB를 제작하였다 (도 2).

<58> 서열번호 12: 5' -CTCGAGCCCGGGGTTTAAGGGCACCAATAA (프라이머 CTR)

<59> 서열번호 13: 5' -CTCGAGCCCGGGGCTTTGCG CCGAATAAAT (프라이머 CTF)

<60> 실시예 3: 만헤이미아 속 LPK 균주의 제작

<61> 도 3은 만헤이미아 속 55E 균주의 *ldhA* 및 *pfl* 유전자를 결실시켜 변이주(LPK)를 제작하는 과정을 나타낸 것이다.

<62> 만헤이미아 속 55E 균주를 LB-글루코스(10g/ℓ 농도의 글루코스를 함유한 Luria-Bertani 배지) 배지에 도말하였다. 36시간 동안 37℃ 배양기에서 배양후, 콜로니를 LB-글루코스 액체배지 10ml에 접종하여, 12시간 배양하였다. 충분히 자란 배양액을 LB-글루코스 액체배지 100ml에 1% 접종하여 200rpm 37℃ 진탕 배양기에서 배양하였다.

- <63> 약 4-5시간 후, OD가 0.2-0.3 정도가 되면, 이것을 4℃ 4000rpm 10분 조건으로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 상등액은 버리고, 4℃ 상태의 10% 글리세롤(glycerol) 용액 200ml로 세포를 재현탁하였다. 다시 4℃, 4000rpm, 10분 조건으로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 상등액은 버리고, 4℃, 10% 글리세롤 용액 200ml로 세포를 재현탁하고, 4℃, 4000rpm, 10min 조건으로 원심분리하여 세포를 수득하였다. 세포와 글리세롤 부피비가 1:1이 되도록 글리세롤 양을 조절하여, 재현탁하였다.
- <64> 이렇게 얻은 세포 농축액과 실시예 1 및 2에서 제작된 유전자 교환벡터 pMLK0-sacB 및 pMPK0-sacB를 혼합한 다음, 1.8kV, 25 μ F, 200ohms의 조건으로 일렉트로포레이션(electroporation)을 수행하였다. 전기충격후, LB-글루코스 액체배지 1ml을 가하여 200rpm 37℃ 진탕 배양기에서 1시간동안 배양하였다.
- <65> 배양액을 적절한 항생제[카나마이신(Km)의 경우, 최종농도 25 μ g/ml 또는 클로람페니콜(Cm)의 경우, 최종농도 6.8 μ g/ml]를 함유한 LB-글루코스 고체배지에 도말하여, 37℃에서 48시간이상 배양한 후, 콜로니가 형성되는지 관찰하였다.
- <66> 콜로니가 형성되면, 이중 교차(double crossover)만 일어난 것을 골라내기 위해, 이것을 Km(25 μ g/ml) 또는 Cm(6.8 μ g/ml)를 함유한 LB-수크로스(100g/l 농도의 수크로스를 함유한 Luria-Bertani 배지) 배지에 도말(streaking)하였다. 24 시간후에 형성된 콜로니를 다시 한번 더 같은 플레이트에 도말하였다.
- <67> 상기 플레이트에서 형성된 콜로니(변이주)를 항생제가 함유된 LB-glucose 액체배지에서 배양하고, 배양된 균주로부터, 로첼(Rochelle)의 방법(Rochelle et al., FEMS Microbiol. Lett., 100:59-66, 1992)을 응용하여 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 변이

주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행한 다음, PCR 산물을 전기영동함으로써, *ldhA* 유전자와 *pfl* 유전자의 결실 여부를 확인하였다.

<68> *ldhA* 유전자의 결실 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 2번의 PCR을 수행하였다. 우선, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 14와 15의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

<69> 서열번호 14: 5' -GACGTTTCCCGTTGAATATGGC (프라이머 KM1)

<70> 서열번호 15: 5' -CATTGAGGCGTAT TATCAGGAAAC (프라이머 LU1)

<71> 다음으로, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 16과 17의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

<72> 서열번호 16: 5' -GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG (프라이머 KM2)

<73> 서열번호 17: 5' -CCTCTTACGATGACGCATCTTCC (프라이머 LD2)

<74> 상기 두차례의 PCR 반응에서 얻어진 반응물을 겔 전기영동하여 그 크기(1.5kb)로 *ldhA* 유전자의 결실여부를 확인하였다 (도 4).

<75> *pfl* 유전자의 결실여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 2번의 PCR을 수행하였다. 우선, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 18과 19의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

<76> 서열번호 18: 5' -GGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCAT (프라이머 CM1)

<77> 서열번호 19: 5' -CTTTGCAACATTATGG TATGTATTGCCG (프라이머 PU1)

<78> 다음으로, 상기 변이주의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 20과 21의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

<79> 서열번호 20: 5' -TACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAA (프라이머 CM2)

<80> 서열번호 21: 5' -CCCCAGCATGTGCAAATCTTCGTCAC (프라이머 PD2)

<81> 상기 두차례의 PCR 반응에서 얻어진 반응물을 겔 전기영동하여 그 크기(1.5kb)로 pfl 유전자의 결실여부를 확인하였다 (도 4). 도 4에 있어서, M은 Lambda HindIII 사이즈 마커를, 레인 1-3은 PCR 산물 LU1 & KM1(1.5kb)을, 레인 4-6은 PCR 산물 LD2 & KM2(1.7kb)를, 레인 7-9는 PCR 산물 PU1 & CM1(2.2kb)을, 레인 10-12는 PCR 산물 PD2 & CM2(1.6kb)를 나타낸다.

<82> ldhA 유전자 결실은 서열 번호 14 와 15의 프라이머 LU1 과 KM1의 PCR의 결과물이 1.5kb 로 얻어지고, 동시에 서열번호 16 와 17의 프라이머 LD2 과 KM2 의 PCR 결과물이 1.7kb로 얻어 지는 것으로 확인하였다. 그리고, pfl 유전자의 결실은 서열번호 18 와 19의 프라이머 PU1 과 CM1의 PCR 결과물이 2.2kb로 얻어지고, 동시에 서열번호 20과 21의 프라이머 PD2 과 CM2의 PCR 결과물이 1.6kb로 얻어짐으로 확인하였다. 각각의 프라이머의 위치는 도 3에 표시하였다.

<83> 상기 방법으로 제작된 변이균주, 즉 ldhA 및 pfl 유전자가 결실된 만헤이미아 속 균주를 만헤이미아 속 LPK(*Mannheimia* sp. LPK)로 명명하고, 이를 2003년 11월 26일자로 국제기탁기관인 한국생명공학연구원(KRIBB) 유전자은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52소재)에 기탁번호 'KCTC 10558BP'로 기탁하였다.

<84> 실시예 4: 이산화탄소가 포화된 혐기조건하에서의 발효특성

<85> 상기 실시예 3에서 제작된 만헤이미아 속 LPK의 발효능을 알아보기 위하여, 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건 하에 배양하고, 이로부터 생산되는 반응산물을 분석하였다.

<86> 먼저, 20g/L의 포도당, 5g/L의 폴리펩톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 1g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 10g/L의 $MgCO_3$ 로 구성된 전배양 배지 100ml를 제조하고, 이에 탄산가스를 주입한 다음, 만헤이미아 속 LPK를 접종한 후, 39℃에서 14시간동안 전배양을 수행하였다.

<87> 이어, 20g/L의 포도당, 5g/L의 폴리펩톤, 5g/L의 효모추출물, 3g/L의 K_2HPO_4 , 1g/L의 NaCl, 5g/L의 $(NH_4)_2SO_4$, 0.2g/L의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2g/L의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 5g/L의 Na_2CO_3 로 구성된 본배양 배지 0.9L를 2.5L의 배양조에 넣고, 100ml의 전배양된 미생물을 접종한 다음, 39℃의 온도와 pH 6.5의 조건하에 탄산가스를 0.25vvm의 유속으로 공급하면서 회분식 배양을 수행하였다. 배양 진행 중, 시간별로 배양기로부터 배지를 채취하고, 이로부터 세포농도, 숙신산, 포도당, 젖산, 초산 및 개미산의 양을 측정하였다. 배양액 내의 세포농도는 분광광도계 (spectrophotometer, Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech., Sweden)를 이용하여 측정하고, 배지내에 포함된 숙신산, 포도당, 젖산, 초산 및 개미산의 양을 HPLC(Aminex HPX-87H column, Bio-Rad, USA)로서 측정하였다(도 5). 도 5에서 심볼은 각각 배양시간에 따른 세포농도(●), 숙신산(○), 포도당(■), 개미산(◇) 및 초산(△)의 농도변화를 나타낸다.

<88> 도 5에서 보듯이, 14시간의 배양 후에 소모된 포도당의 농도는 20g/L이었고, 생성된 숙신산의 농도는 17.2g/L이었다. 이에 따른 숙신산의 수율(생성된 숙신산의 양/소모된 포도당의 양)은 81%이었고, 숙신산의 부피생산성(생성된 숙신산의 농도/소요된 시간)은 1.23g/L/h이었다.

<89> 본 발명의 만헤이미아 속 LPK를 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 배양하여 수득하는 숙신산의 생산방법은, 모균주인 만헤이미아 속 55E를 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서

배양하여 수득하는 숙신산의 생산방법보다 수율면에서 크게 향상되었으며, 숙신산/초산의 비율면에서는 40.7:1로서 부산물이 거의 없이 숙신산을 수득할 수 있었다.

<90> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<91> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 루멘 박테리아의 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자(pf1)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주 및 상기 변이균주를 혐기적 조건에서 배양하여 고수율로 숙신산을 제조하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

<92> 본 발명에 따른 만헤이미아 속 LPK 균주는 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서는 숙신산을 생산하고, 산소에 대한 저항성이 높은 통성혐기성 균주이기 때문에, 상기 균주를 이용하여 숙신산을 제조하는 방법은 절대 혐기성 균주를 이용하여 숙신산을 생산하는 종래의 방법에 비해 산소 노출 등으로 인한 발효공정의 불안정성을 획기적으로 제거할 수 있을 뿐만 아니라,

다른 유기산의 생성을 제거함으로써, 정제공정 및 생산 수율의 최적화 및 극대화를 이루는 것이 가능하다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

루멘 박테리아의 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자(pfl)가 결실되어 있고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.) 균주인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주.

【청구항 4】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 루멘 박테리아는 다른 유기산은 생성하지 않으면서 숙신산만을 생성하는 동형발효 균주인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균

주.

【청구항 5】

만헤이미아 속(*Mannheimia* sp.), 액티노바실러스 속(*Actinobacillus* sp.) 및 언에어로바 이오스피리illum 속(*Anaerobiospirillum* sp.)으로 구성된 군에서 선택되는 루멘 박테리아 균주로부터 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(ldhA)와 피루브산-개미산 분해효소(pyruvate-formate lyase)를 코딩하는 유전자(pfl)를 결실시켜 수득되고, 혐기적 조건에서 다른 유기산은 거의 생성하지 않으면서 숙신산을 고농도로 생성하는 특성을 가지는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 ldhA 유전자와 pfl 유전자의 결실은 상동성 재조합 (homologous recombination)에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상동성 재조합은 결실된 ldhA 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 및 결실된 pfl 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 결실된 *ldhA* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 pMLKO-sacB이고, 상기 결실된 *pf1* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터는 pMPKO-sacB인 것을 특징으로 하는 루멘 박테리아 변이균주의 제조방법.

【청구항 9】

결실된 *ldhA* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 pMLKO-sacB.

【청구항 10】

결실된 *pf1* 유전자를 포함하는 유전자 교환벡터 pMPKO-sacB.

【청구항 11】

만헤이미아 속 55E(*Mannheimia succiniciproducens* 55E, KCTC 0769BP)의 *ldhA* 유전자와 *pf1* 유전자가 결실된 만헤이미아 속 LPK(*Mannheimia* sp. LPK, KCTC 10558BP).

【청구항 12】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 루멘 박테리아 변이균주를 혐기적 조건에서 배양하는 단계와 배양액으로부터 숙신산을 회수하는 단계를 포함하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 혐기적 조건은 이산화탄소 및/또는 질소를 이용하여 조성하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 14】

제12항에 있어서, 상기 배양은 다른 유기산은 생성되지 않으면서 숙신산만이 생성되는 동형발효인 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 15】

제12항에 있어서, 배양은 35~45℃의 온도와 6.0~7.5의 pH에서 이산화탄소 또는 이산화탄소를 포함하는 공기를 0.1~0.4vvm의 유속으로 공급하면서 수행하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 16】

제11항의 만헤이미아 속 LPK(*Mannheimia* sp. LPK, KCTC 10558BP) 균주를 혐기적 조건에서 배양하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 17】

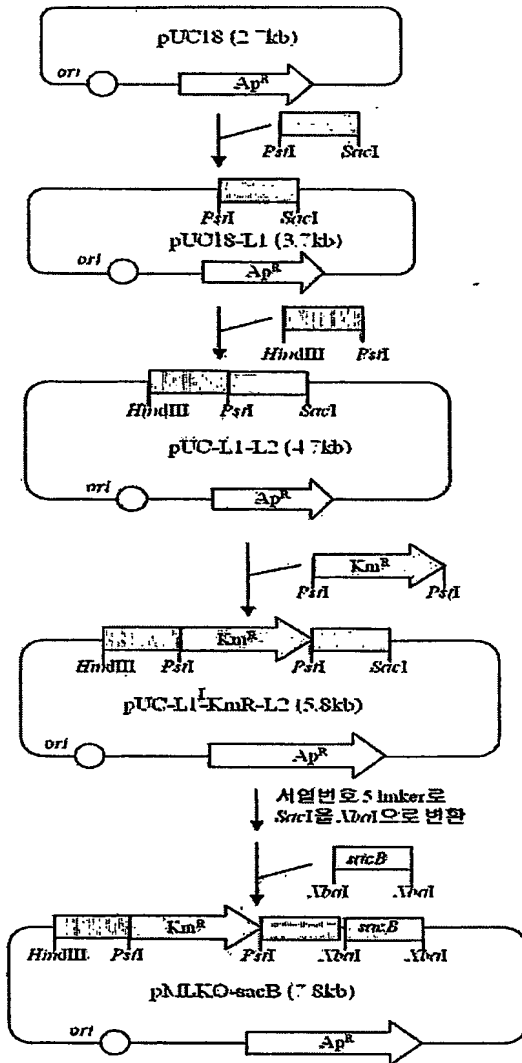
제16항에 있어서, 혐기적 조건은 이산화탄소 및/또는 질소를 이용하여 조성하는 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【청구항 18】

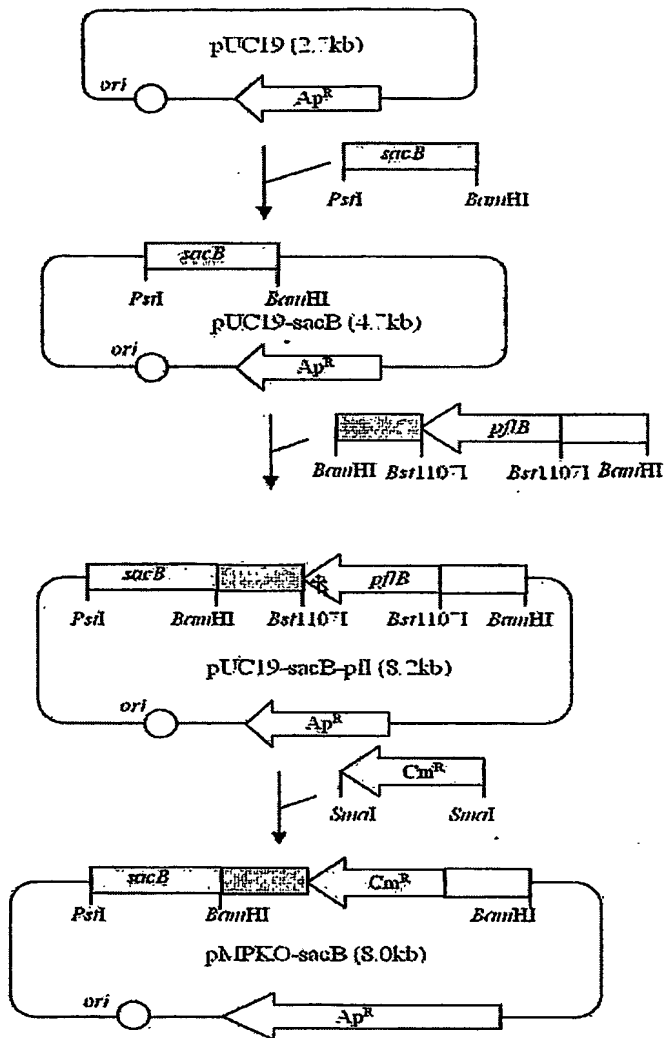
제16항에 있어서, 상기 배양은 다른 유기산은 생성되지 않으면서 숙신산만이 생성되는 동형발효인 것을 특징으로 하는 숙신산의 제조방법.

【도면】

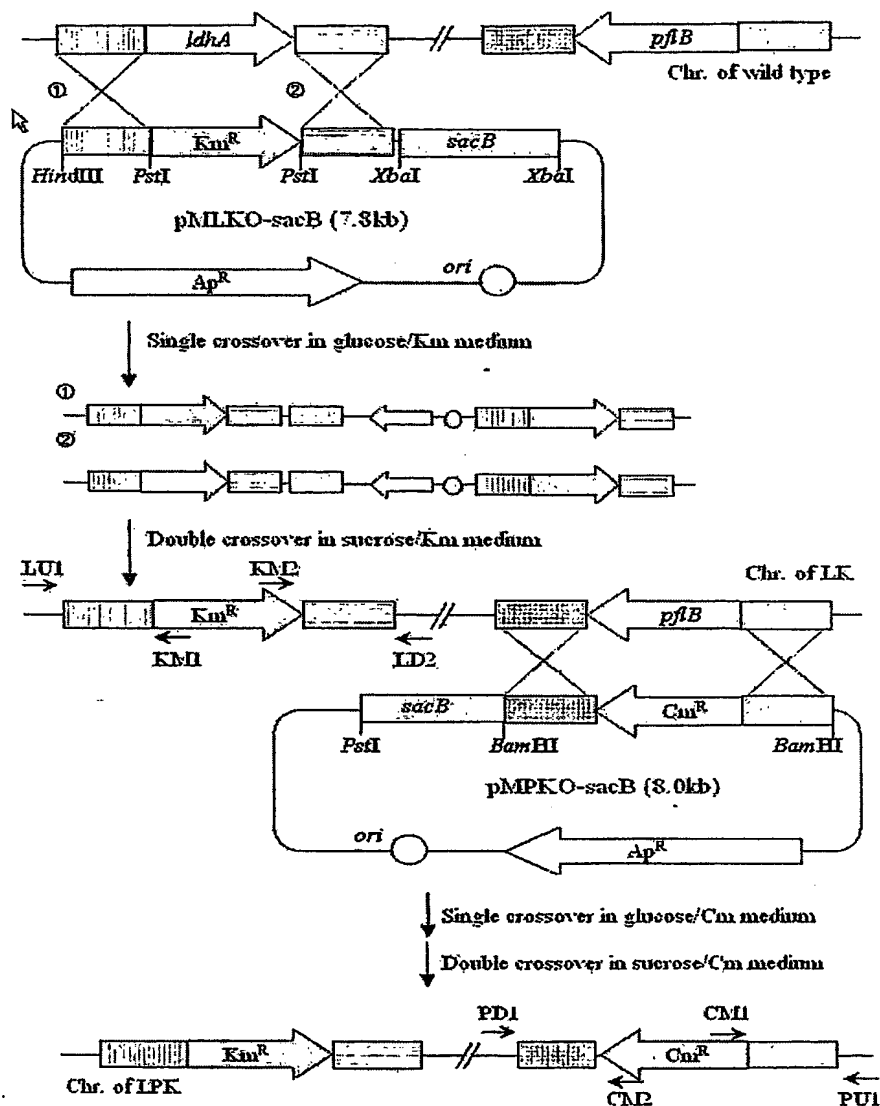
【도 1】



【도 2】



【도 3】

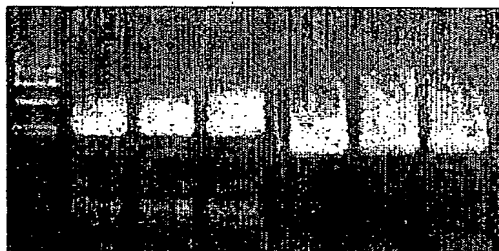


【도 4】

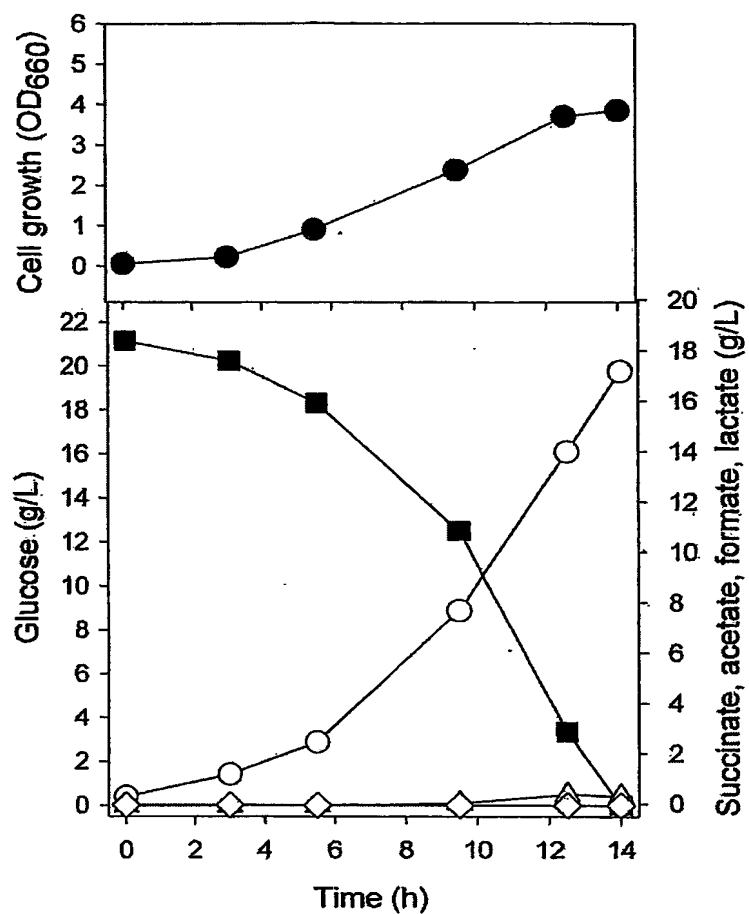
M 1 2 3 4 5 6



M 7 8 9 10 11 12



【도 5】



【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology <120> Variant of Lumen Bacteria and Process
 for Preparing Succinic Acid Employing the Same <130> P03-316 <160> 21 <170> KopatentIn
 1.71 <210> 1 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer LS1 <400>

cagtgaagga gtcctgaac gcatccgccg	30 <210>	2 <211>	30 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer LP1 <400>	2 ctttatcgaa tctgcaggcg gtttccaaa	
30 <210> 3 <211> 30 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer LP2 <400>	3
gtactgtaaa ctgcagcttt catagttagc	30 <210>	4 <211>	30 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer LH2 <400>	4 gccgaaagtc aagcttgccg tcgttttagtg	
30 <210> 5 <211> 10 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Linker 1 <400>	5
tctagaagct	10 <210>	6 <211>	29 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer SXF <400>	6 gctctagacc ttctatcgcc ttcttgacg	
29 <210> 7 <211> 29 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer SXR <400>	7
gctctagagg ctacaaaatc acgggcgtc	29 <210>	8 <211>	30 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer SBG <400>	8 agcggatccc cttctatcgc cttcttgacg	
30 <210> 9 <211> 30 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer SPR <400>	9
gtcctgcagg gctacaaaat cacgggcgtc	30 <210>	10 <211>	30 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer PB1 <400>	10 catggcggat ccaggtacgc tgatttcgat	
30 <210> 11 <211> 30 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer PB2 <400>	1
caaggatcca acggataaag cttttattat	30 <210>	12 <211>	30 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer CTR <400>	12 ctcgagcccg ggggttaagg gcaccaataa	
30 <210> 13 <211> 30 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer CTF <400>	1
ctcgagcccc gggctttgcg ccgaataaat	30 <210>	14 <211>	22 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer KM1 <400>	14 gacgtttccc gttgaatatg gc	
22 <210> 15 <211> 24 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer LU1 <400>	1
cattgaggcg tattatcagg aaac	24 <210>	16 <211>	23 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>	Primer KM2 <400>	16 gcagtttcat ttgatgctcg atg	
23 <210> 17 <211> 24 <212> DNA <213>	Artificial Sequence <220> <223>	Primer LD2 <400>	1
cctcttacga tgacgcattt ttcc	24 <210>	18 <211>	30 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer CM1 <400> 18 ggtggtatat ccagtgattt ttttctccat
 30 <210> 19 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer PU1 <400> 1
 ctttgaaca ttatggtatg tattgccg 28 <210> 20 <211> 30 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer CM2 <400> 20 tactgcatg agtggcaggg cggggcgtaa
 30 <210> 21 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer PD2 <400>
 21 ccccagcatg tgcaaatttt cgtcac 26

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.12.09
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0084934
【출원일자】	2003.11.27
【심사청구일자】	2003.11.27
【발명의 명칭】	루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2003-0076998-22
【발송일자】	2003.12.09
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규 정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이처영 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【추가심사청구료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

0030084934

출력 일자: 2004/5/28

【첨부서류】

1. 보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정대상항목】 식별번호 92

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명에 따른 만헤이미아 속 LPK 균주는 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 숙신산을 생산하고, 산소에 대한 저항성이 높은 통성혐기성 균주이기 때문에, 상기 균주를 이용하여 숙신산을 제조하는 방법은 절대 혐기성 균주를 이용하여 숙신산을 생산하는 종래의 방법에 비해 산소 노출 등으로 인한 발효공정의 불안정성을 획기적으로 제거할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 유기산의 생성을 제거함으로써, 정제공정 및 생산 수율의 최적화 및 극대화를 이루는 것이 가능하다.

기탁중

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

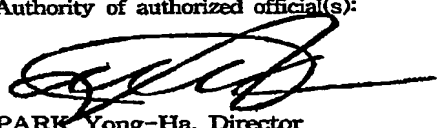
INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : LEE, Sang Yup

Korea Advanced Institute of Science and Technology,
#373-1, Kuseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701,
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Mannheimia sp. LPK	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 10558BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on November 26 2003 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-333, Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  PARK Yong-Ha, Director Date: November 28 2003

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.12.12
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0084934
【출원일자】	2003.11.27
【심사청구일자】	2003.11.27
【발명의 명칭】	루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0450125-82
【접수일자】	2003.11.27
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	미생물 기탁
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)
【수탁번호】	KCTC 10558BP
【수탁일자】	2003.11.26
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규 정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이처영 (인)

0030084934

출력 일자: 2004/5/28

【수수료】

【보정료】

0 원

【기타 수수료】

원

【합계】

0 원

【첨부서류】

1. 기타첨부서류[미생물 기탁증]_1통(이하에 명기한 제출서류에 첨부 된 것을 원용) [서류명]명세서등 보정서
[출원번호]10-2003-0084934

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.04.23
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0084934
【출원일자】	2003.11.27
【심사청구일자】	2003.11.27
【발명의 명칭】	루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법{Variant of Rumen Bacteria and Process for Preparing Succinic Acid Employing the Same}
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0450125-82
【접수일자】	2003.11.27
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규 정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이처영 (인)

0030084934

출력 일자: 2004/5/28

【수수료】

【보정료】 3,000 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 3,000 원

【보정대상항목】 발명(고안)의 명칭

【보정방법】 정정

【보정내용】

루멘 박테리아 변이균주 및 이를 이용한 숙신산의 제조방법{Variant of Rumen Bacteria and Process for Preparing Succinic Acid Employing the Same}

【보정대상항목】 서열목록

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 서열목록

【보정방법】 정정

【보정내용】

【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology <120> Variant of Rumen Bacteria and Process for Preparing Succinic Acid Employing the Same <130> P03-316 <160> 21 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer LS1 <400> 1 cagtgaagga gtcctgtaac gcatccgccg 30 <210> 2 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer LP1 <400> 2 ctttatcgaa tctgcaggcg gtttccaaaa

30 <210> 3 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Primer LP2 <400> 3 gtactgtaaa ctgcagcttt catagttagc

30 <210> 4 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Primer LH2 <400> 4 gccgaaagtc aagcttgccg tcgtttagtg

30 <210> 5 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Linker 1 <400> 5 tctagaagct

10 <210> 6 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Primer SXF <400> 6 gctctagacc ttctatcgcc ttcttgacg

29 <210> 7 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Primer SXR <400> 7 gctctagagg ctacaaaatc acgggcgctc

29 <210> 8 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Primer SBG <400> 8 agcggatccc cttctatcgc cttcttgacg

30 <210> 9 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> Primer SPR <400> 9 gtcctgcagg gctacaaaat cacgggcgctc

30 <210> 10 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Prmer PB1 <400> 10 catggcggat ccaggtacgc tgatttcgat

30 <210> 11 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer PB2 <400> 11 caaggatcca acggataaag cttttattat

30 <210> 12 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer CTR <400> 12 ctcgagcccg gggtttaagg gcaccaataa

30 <210> 13 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>

<223> Primer CTF <400> 13 ctcgagcccc gggctttgcg ccgaataaat
30 <210> 14 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer KM1 <400> 14 gacgtttccc gttgaatatg gc
22 <210> 15 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer LU1 <400> 15 cattgaggcg tattatcagg aaac
24 <210> 16 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer KM2 <400> 16 gcagtttcat ttgatgctcg atg
23 <210> 17 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer LD2 <400> 17 cctcttacga tgacgcatct ttcc
24 <210> 18 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer CM1 <400> 18 ggtggatatat ccagtgattt ttttctccat
30 <210> 19 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer PU1 <400> 19 ctttgcaaca ttatgggatg tattgccg
28 <210> 20 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer CM2 <400> 20 tactgcatg agtggcaggg cggggcgtaa
30 <210> 21 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
<223> Primer PD2 <400> 21 cccagcatg tgcaaattctt cgtcac

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.